



Hrvatski liječnički zbor
Hrvatsko društvo za kliničku mikrobiologiju
Smjernice za mikrobiološku dijagnostiku

BAKTERIOLOŠKA DIJAGNOSTIKA INFEKCIJA DIŠNOG SUSTAVA

Pristaš I, Abram M, Bubonja Šonje M, Tićac B, Vučković D, Tambić Andrašević A

Veljača, 2015.

hd:km

BAKTERIOLOŠKA DIJAGNOSTIKA INFEKCIJA DIŠNOG SUSTAVA

Pristaš I¹, Abram M^{2,4}, Bubonja Šonje M^{2,4}, Tićac B^{3,4}, Vučković D⁴,
Tambić Andrašević A¹

¹ Klinika za infektivne bolesti „dr. Fran Mihaljević“, Zagreb

² Klinički bolnički centar Rijeka, Rijeka

³ Nastavni zavod za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije, Rijeka

⁴ Medicinski fakultet Rijeka, Rijeka

Izdavač

HRVATSKI LIJEČNIČKI ZBOR

HRVATSKO DRUŠTVO ZA KLINIČKU MIKROBIOLOGIJU

Tisak

INTERGRAF-BI

Lektura

Mojprijevod.hr

Zagreb, 2015.

ISBN 978-953-7959-33-3

Citiranje smjernica

Ovu publikaciju treba citirati na sljedeći način:

Pristaš I, Abram M, Bubonja Šonje M, Tićac B, Vučković D, Tambić Andrašević A.

Bakteriološka dijagnostika infekcija dišnog sustava: smjernice za mikrobiološku dijagnostiku Hrvatskog društva za kliničku mikrobiologiju Hrvatskog liječničkog zbora. Zagreb: Hrvatsko društvo za kliničku mikrobiologiju; 2015.

SADRŽAJ

PREDGOVOR	i
IZRADA SMJERNICA	ii
1. GORNJI DIŠNI SUSTAV	1
1.1. Uvod	1
1.2. BRIS USNE ŠUPLJINE	3
1.2.1 Uvod	3
1.2.2. Prikupljanje, transport i pohrana uzorka	3
1.2.3. Kultivacija	4
1.2.4. Mikroskopski preparat	4
1.2.5. Identifikacija patogena i testiranje osjetljivosti na antibiotike	4
1.2.6. Izdavanje nalaza	4
1.3 BRIS NOSA	5
1.3.1. Uvod	5
1.3.2. Prikupljanje, transport i pohrana uzorka	5
1.3.3. Kultivacija	6
1.3.4. Identifikacija patogena i testiranje osjetljivosti na antibiotike	6
1.3.5. Izdavanje nalaza	7
1.4. BRIS ŽDRIJELA	8
1.4.1. Uvod	8
1.4.2. Prikupljanje, transport i pohrana uzorka	8
1.4.3. Kultivacija	9
1.4.4. Identifikacija patogena i testiranje osjetljivosti na antibiotike	9
1.4.5. Izdavanje nalaza	10
1.5. BRIS NAZOFARINKSA	11
1.5.1. Uvod	11
1.5.2. Prikupljanje, transport i pohrana uzorka	11
1.5.2.1. Bris nazofarinksa na <i>B. pertussis</i> i <i>B. parapertussis</i>	11

1.5.2.2. Bris nazofarinksa na difteriju, meningokok i BHS-A	12
1.5.3. Kultivacija	12
1.5.3.1. Kultivacija brisa nazofarinksa na bordetele	12
1.5.3.2. Kultivacija brisa nazofarinksa na difteriju, meningokok i BHS-A	12
1.5.4. Identifikacija patogena i testiranje osjetljivosti na antibiotike	12
1.5.5. Izdavanje nalaza	12
1.6. BRIS UHA	13
1.6.1. Uvod	13
1.6.2. Obrada brisa uha kod upale vanjskog zvukovoda	13
1.6.2.1. Prikupljanje, transport i pohrana uzorka	13
1.6.3. Obrada brisa uha i tekućine dobivene timpanocentezom kod upale srednjeg uha	14
1.6.3.1. Prikupljanje, transport i pohrana uzorka	14
1.6.4. Kultivacija	15
1.6.5. Identifikacija patogena i testiranje osjetljivosti na antibiotike	16
1.6.6. Izdavanje nalaza	16
1.7. ASPIRAT SINUSA	17
1.7.1. Uvod	17
1.7.2. Prikupljanje, transport i pohrana uzorka	18
1.7.3. Mikroskopski preparat	18
1.7.4. Kultivacija	19
1.7.5. Identifikacija patogena i testiranje osjetljivosti na antibiotike	20
1.7.6. Izdavanje nalaza	20
1.8. BRIS OKA	21
1.8.1. Uvod	21
1.8.2. Prikupljanje, transport i pohrana uzorka	23
1.8.3. Kultivacija	24
1.8.4. Identifikacija patogena i testiranje osjetljivosti na antibiotike	25
1.8.5. Izdavanje nalaza	25

2. DONJI DIŠNI SUSTAV	26
2.1. UVOD	26
2.1.1. Etiologija infekcija donjeg dijela dišnog sustava	27
2.2. UZORCI IZ DONJEG DIJELA DIŠNOG SUSTAVA	28
2.2.1. Iskašljaj (sputum)	28
2.2.2. Endotrahealni aspirat (ETA)	28
2.2.3. Uzorci dobiveni bronhoskopijom	28
2.2.4. Primarno sterilni uzorci	29
2.3. TRANSPORT I POHRANA UZORAKA	29
2.3.1. Primarno nesterilni uzorci (iskašljaj, ETA, BAL)	29
2.3.2. Primarno sterilni uzorci	29
2.4. KRITERIJI ZA ODBACIVANJE UZORAKA	30
2.4.1. Za dijagnostiku infekcija donjeg respiratornog trakta treba odbaciti sljedeće uzorke	30
2.4.2. Mikroskopski preparat iskašljaja, ETA, BA	30
2.5. KVANTITATIVNO NASAĐIVANJE ETA I UZORAKA DOBIVENIH BRONHOSKOPIJOM	31
2.6. KULTIVACIJA UZORAKA IZ DONJEG DIJELA DIŠNOG SUSTAVA	33
2.7. INTERPRETACIJA NALAZA U UZORCIMA IZ DONJEG DIJELA DIŠNOG SUSTAVA	34
2.8. IDENTIFIKACIJA PATOGENA I TESTIRANJE OSJETLJIVOSTI NA ANTIBIOTIKE	35
2.9. IZDAVANJE NALAZA UZORAKA IZ DONJEG DIJELA DIŠNOG SUSTAVA	35
REFERENCE	37

PREDGOVOR

Ove smjernice predstavljaju naputke Hrvatskog društva za kliničku mikrobiologiju (HDKM) o načinu prikupljanja, pohranjivanja, transporta i laboratorijske obrade uzoraka bitnih za potrebe dijagnostike infekcija dišnih putova. Kako je gornji dišni sustav gusto naseljen fiziološkom mikrobiotom, većina uzoraka je kontaminirana bakterijama koje ometaju pravilnu obradu i smislenu interpretaciju bakterioloških pretraga. Bakteriološka obrada većine uzoraka uvelike ovisi o kvaliteti uzorka, odnosno, o upućenosti zdravstvenih djelatnika različitih profila koji započinju pretragu uzimajući uzorak. Slijed obrade uzorka u laboratoriju često ovisi o poznavanju pacijenta i kliničke slike te je podložan individualnom pristupu mikrobiologa koji vodi pretragu. Kako bismo, pri svakodnevnom donošenju odluka, postigli što viši stupanj standardizacije među hrvatskim laboratorijima pristupili smo pisanju hrvatskih smjernica koje se oslanjaju na medicinske podatke zasnovane na dokazima, tamo gdje su isti dostupni te načelima dobre laboratorijske prakse opisanima u međunarodnim udžbenicima i postupnicima. Kako se različiti međunarodni postupnici ponekad razlikuju u detaljima prikupljanja, pohranjivanja, transporta i laboratorijske obrade uzoraka, pri pisanju ovih smjernica razmotrili smo i specifičnosti organizacije hrvatskog zdravstvenog sustava i mikrobiološke službe te u pojedinim slučajevima nudimo nekoliko prihvatljivih opcija, uz preporuku najboljeg pristupa za hrvatske uvjete. Ove smjernice se, također, osvrću na neke postupke koji su se uvriježili u našoj praksi, bez dokaza o kliničkoj opravdanosti takvih postupaka. To se prvenstveno odnosi na uzimanje briseva nazofarinksa kao dijagnostičkog postupka u dokazivanju bakteriološke etiologije infekcija gornjih dišnih putova. Iako zasnovana na činjenici da se bakterijski uzročnici upale uha i sinusa šire sa sluznice nazofarinksa, pretpostavka da će bris nazofarinksa s visokom specifičnošću otkriti uzročnika ovih infekcija pokazala se nedovoljno pouzdanom, a u svjetlu poticanja nepotrebne primjene antibiotika i štetnom. Nadamo se kako će postojanje hrvatskih smjernica o bakteriološkoj dijagnostici infekcija dišnih putova doprinijeti širenju dobre kliničke i laboratorijske prakse u Hrvatskoj.

Prof.dr.sc. Arjana Tambić Andrašević
Predsjednica HDKM-a

IZRADA SMJERNICA

Upravni odbor HDKM-a je imenovao radnu grupu za izradu smjernica koje se odnose na bakteriološku dijagnostiku infekcija dišnih putova. Članovi radne grupe su, na stručnom sastanku Društva kroz niz predavanja iznijeli osnovna načela dobre laboratorijske prakse vezane uz bakteriološku obradu uzoraka dišnog sustava te na načelu medicine zasnovane na dokazima, sastavili prijedlog hrvatskih smjernica. Prijedlog smjernica je bio otvoren za komentare o kojima se raspravljalo na sljedećem sastanku Društva. Upravni odbor Društva je usvojio prerađeni prijedlog kao službene smjernice Društva. Revizija smjernica predviđa se za pet godina ili ranije, ako se za tim ukaže potreba. Smjernice su namijenjene svim laboratorijskim djelatnicima koji se bave bakteriološkom obradom uzoraka dišnog sustava te u određenim podpoglavljima i svim zdravstvenim djelatnicima koji sudjeluju u indiciranju pretraga te prikupljanju, pohrani i transportu uzoraka. Smjernice su dostupne u tiskanom obliku te na www.hdkm.hr

Članovi radne grupe za izradu smjernica:

Prof.dr.sc. Maja Abram, dr.med., Klinički bolnički centar Rijeka, Medicinski fakultet Rijeka, Rijeka

Doc.dr.sc. Marina Bubonja Šonje, dr.med., Klinički bolnički centar Rijeka, Medicinski fakultet Rijeka, Rijeka

Irina Pristaš, dr.med., Klinika za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“, Zagreb

Prof.dr.sc. Arjana Tambić Andrašević, dr.med., Klinika za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“, Zagreb

Prof.dr.sc. Brigita Tićac, dr.med., Nastavni zavod za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije, Medicinski fakultet Rijeka, Rijeka

Prof.dr.sc. Darinka Vučković, dr.med. Medicinski fakultet Rijeka, Rijeka

Zahvala

HDKM se, u prvom redu, zahvaljuje svim članovima radne grupe koji su sudjelovali u izradi ovih smjernica te njihovim kolektivima koji su poduprijeli njihov angažman na sastavljanu smjernica. Također se zahvaljujemo svima koji su svojim komentarima i diskusijama doprinijeli razvoju smjernica, a posebno članovima HDKM koji su uputili pisane komentare: Silvani Balzar, Ireni Franolić, Maji Farkaš, Ivani Goić Barišić, Zoranu Herljeviću, Sandi Sardelić, Mariji Tonkić i Vinku Zoraniću.

1. GORNJI DIŠNI SUSTAV

1.1. UVOD

Uzorci iz gornjeg dišnog sustava (bris ždrijela, bris nosa, bris nazofarinksa, ispirci nazofarinksa, bris oka, bris uha, bris usne šupljine) često su kontaminirani fiziološkom mikrobiotom gornjeg dišnog sustava. Respiratorni patogeni prisutni u ždrijelu ili nosu tijekom bolesti mogu biti prisutni i kao kliconoštvo kod zdravih ljudi.

Iz navedenih razloga, ovi neinvazivni uzorci u najvećem broju slučajeva ne pružaju dovoljno specifične informacije o ulozi bakterija kao što su *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* i *Moraxella catarrhalis* u infekcijama donjeg dišnog sustava, upalama srednjeg uha ili sinusitisa te se ne bi trebali uzimati rutinski. Liječnike, koji uzimaju i šalju uzorke u laboratorij, potrebno je informirati i uputiti na činjenicu da su, u svrhu postavljanja dijagnoze upale srednjeg uha ili sinusitisa, potrebni invazivniji uzorci (punktat sinusa, tekućina dobivena timpanocentezom) (1,8,10,11,15).

Neinvazivi uzorci su od koristi u svrhu:

- dijagnostike specifičnih patogena - beta hemolitičkog streptokoka grupe A (BHS-A), *Bordetella pertussis*, *Corynebacterium diphtheriae* i respiratornih virusa koji, kod simptomatskih pacijenata, uzrokuju bolest s velikom vjerojatnošću
- detekcije kliconoštva nekih uzročnika (npr. stafilokoka kod kirurških pacijenata) (1,11)

Tablica 1. Adekvatni uzorci za dijagnostiku bakterijskih i gljivičnih infekcija gornjeg dišnog sustava (1)

UZORAK	TRAŽENI PATOGEN	BOLEST ILI STANJE
Bris usne šupljine, jezika	<i>Candida albicans</i>	Oralna kandidijaza
	BHS-A, <i>Staphylococcus aureus</i>	Ulkus usne šupljine, parotitis
Bris nosa	<i>Staphylococcus aureus</i> * <i>S. aureus</i> (MRSA)*	Kliconoštvo
	<i>Klebsiella ozaenae</i> *	Ozena
	<i>Klebsiella rhinoscleromatis</i> *	Rinoskleroma
Bris ždrijela	BHS-A	Streptokokni faringitis
	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> *	Difterija
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> *	Gonokokni faringitis
	<i>Neisseria meningitidis</i> *	Meningokokno kliconoštvo
	<i>Borrelia vincentii</i> (spirohete)* + anaerobi (fuziformni štapići)*	Vincentova angina
Bris nazofarinksa	<i>Bordetella pertussis</i> *	Pertusis (hripavac)
	BHS-A	Streptokokni faringitis
	<i>Neisseria meningitidis</i> *	Meningokokno kliconoštvo
	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> *	Difterija
Bris uha (zvukovoda)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Otitis externa (upala zvukovoda)
	<i>S. aureus</i>	
	BHS-A	
	Rjeđi uzročnik: <i>Vibrio alginolyticus</i>	
	<i>Aspergillus</i> spp. i <i>C. albicans</i>	Kronični otitis externa
Tekućina dobivena timpanocentezom, tekućina nakon perforacije bubnjića uzeta brisom	<i>S. pneumoniae</i> <i>H. influenzae</i> <i>M. catarrhalis</i> Rjeđi uzročnici: <i>S. aureus</i> , BHS-A, enterobakterije, <i>Alloicoccus otitidis</i> , čista kultura bilo kojeg mikroorganizma**	Akutni otitis media (akutna upala srednjeg uha)
	<i>Pseudomonadaceae</i> , <i>S. aureus</i> /MRSA, anaerobi, čista kultura bilo kojeg mikroorganizma**	Kronični otitis media (kronična upala srednjeg uha)
Punktat sinusa	<i>S. pneumoniae</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>M. catarrhalis</i> , <i>S. aureus</i> , viridans streptokoki, BHS-A anaerobi, čista kultura bilo kojeg mikroorganizma**	Sinusitis
Bris oka (konjunktiva)	<i>Haemophilus influenzae</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>S. aureus</i> <i>N. gonorrhoeae</i> * <i>Moraxella</i> spp. BHS-A <i>Chlamydia trachomatis</i> ***	Konjunktivitis
Hemokultura	<i>Fusobacterium necrophorum</i>	Lemierrova bolest

* Indikacija za pretragu u dogovoru s kliničarem ili uz posebnu naznaku na uputnici

** Kliničku značajnost potrebno je prokomentirati s kliničarem;

*** Molekularna dijagnostika / detekcija antigena / izolacija na kulturi stanica

1.2. BRIS USNE ŠUPLJINE

1.2.1. Uvod

Kandidijaza je najčešći tip infekcije usne šupljine. Najčešći uzročnik je *Candida albicans*. Povremeno u obzir mogu doći i *Candida krusei* te *Candida glabrata* koje češće koloniziraju nego što uzrokuju infekciju usne šupljine. Njihov značaj je u porastu kod imunokompromitiranih bolesnika.

Sijaladenitis, to jest, infekcije žlijezda slinovnica (parotide, submandibularne, sublingualne žlijezde) uključuju supurativne, kronične bakterijske i virusne upale.

- **Parotitis** – najčešći bakterijski uzročnici su stafilocoki, enterobakterije i ostali gram-negativni štapići, viridans streptokoki i anaerobi. Kronični bakterijski parotitis uzrokuju stafilocoki, miješana aerobna i anaerobna mikrobiota usne šupljine. Najčešći uzročnici parotitisa su, ipak, zaušnjaci, influenza i enterovirusi.

Rjeđi uzroci oralnih ulceracija su sifilis i infekcije uzrokovane herpes simplex virusom i *Mycobacterium* spp.

1.2.2. Prikupljanje, transport i pohrana uzorka

- Aseptično uzeti bris s promijenjenog mjesta
- Uzorke je potrebno transportirati i obraditi što je prije moguće
- Bris je potrebno transportirati na jedan od sljedećih načina:
 - o bez transportnog medija na sobnoj temperaturi (ST) do 2 h od uzimanja uzorka
 - o u transportnom mediju (Stuart, Amies) na ST do 24 h od uzimanja uzorka
 - o ako nema transportnog medija, manje povoljna ali prihvatljiva opcija je uzorak pohraniti i transportirati na +4°C, do 24 h od uzimanja uzorka

1.2.3. Kultivacija

Tablica 2. Kultivacija uzoraka iz usne šupljine

Klinička slika /indikacija	Standardni medij	Inkubacija			Očitavanje kultura	Traženi mikroorganizam
		Temp °C	Atmosfera	Vrijeme		
oralna kandidijaza	Sabouraud agar	35-37	aerobna	40-48 h	nakon 24 h i 48 h	<i>C. albicans</i>
ulkus usne šupljine	krvni agar Sabouraud agar	35-37	5-10% CO ₂	16-24 h	nakon 24 h i 48 h	BHS-A <i>S. aureus</i> , gljive

1.2.4. Mikroskopski preparat

- Nalaz kod oralne kandidijaze – u preparatu viđene blastokonidije kvasaca/u preparatu nisu viđene blastokonidije kvasaca

1.2.5. Identifikacija patogena i testiranje osjetljivosti na antibiotike

- Identifikacija se izvodi u skladu s laboratorijskim postupcima za identifikaciju mikroorganizama
- Testiranje osjetljivosti na antibiotike provodi se sukladno Odbora za praćenje rezistencije Akademije medicinskih znanosti Hrvatske (AMZH) i smjernicama EUCAST-a (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*)
- Candida* spp.se rutinski identificiraju do razine *Candida albicans*/*Candida non albicans*, a potrebu za identifikacijom do razine vrste i osjetljivošću na antimikotike potrebno je procijeniti za pojedinačne pacijente u dogovoru s kliničarem

1.2.6. Izdavanje nalaza

Negativan nalaz:

- klinički značajni mikroorganizmi nisu izolirani ili porasla je miješana mikrobiota usne šupljine
- sterilno

Pozitivan nalaz:

- mikroorganizmi navedeni u Tablici 2, u slučaju bakterija s antibiogramom

1.3. BRIS NOSA

1.3.1. Uvod

Većina bakterija na koži i sluznici nosa predstavlja kolonizaciju. Kolonizacija nosa bakterijom *S.aureus* povećava rizik stafilokoknih infekcija, a posebice infekcija postoperativnih rana ili infekcija vezanih uz dijalizni kateter. Kolonizacija je povezana i s učestalim infekcijama kože, kao i s bolničkim infekcijama.

Bris nosa se uzima (1,5,11):

- u svrhu detekcije kliconoštva *S. aureus* prije kardiokirurškog zahvata i kod tvrdokornih piodermija
- u svrhu detekcije kliconoštva MRSA kod kontrole MRSA epidemije na rizičnim odjelima
- kod rijetkih infekcija rinosklerome koje uzrokuje *Klebsiella rhinoscleromatis*
- kod rijetkih infekcija ozene koje uzrokuje *Klebsiella ozaenae*

Na uputnici mora biti naveden uzročnik koji se traži! Ako tog podatka nema, potrebno je nazvati kliničara koji je ordinirao pretragu i razjasniti svrhu uzimanja uzorka te, u odsutnosti indikacije i u dogovoru s kliničarem odbaciti uzorak.

1.3.2. Prikupljanje, transport i pohrana uzorka

- Sterilnim pamučnim štapićem za bris, prethodno navlaženim u sterilnoj fiziološkoj otopini, potrebno je uzeti uzorak rotiranjem u obje nosnice
- Uzorke je potrebno transportirati i obraditi što je prije moguće
- Bris je potrebno transportirati na jedan od sljedećih načina:
 - o bez transportnog medija na sobnoj temperaturi (ST) do 2 h od uzimanja uzorka
 - o u transportnom mediju (Stuart, Amies) do 24 h na ST od uzimanja uzorka
 - o ako nema transportnog medija, manje povoljna ali prihvatljiva opcija je uzorak pohraniti i transportirati na +4°C, do 24 h od uzimanja uzorka

1.3.3. Kultivacija

Tablica 3. Kultivacija brisa nosa

Klinička slika/indikacija	Standardni medij	Inkubacija			Očitavanje kultura	Traženi mikroorganizam
		Temp °C	Atmosfera	Vrijeme		
<i>S. aureus</i> kliconoštvo	krvni agar +/- Mannitol Salt (MS)	35-37	aerobno	16-24 h MS 48h	≥16 h; MS nakon 48h	<i>S. aureus</i>
MRSA kliconoštvo	krvni agar + selektivne MRSA podloge	35-37	aerobno	16-24 h selektivne podloge 48 h	≥16 h selektivne podloge nakon 48h	MRSA
	hranjivi bujon s 2.5% NaCl + subkultivacija na selektivne MRSA podloge					
U rijetkim slučajevima dodati:						
Rinosklerom a/ozena	MacConkey agar (MC)	35-37	aerobno	16-24 h	≥16 h	<i>K.rhinoscleromatis</i> <i>K. ozaenae</i>

1.3.4. Identifikacija patogena i testiranje osjetljivosti na antibiotike

- Identifikacija se izvodi u skladu s laboratorijskim postupcima za identifikaciju mikroorganizama
- Testiranje osjetljivosti na antibiotike izvodi se u skladu sa smjernicama Odbora za praćenje rezistencije Akademije medicinskih znanosti Hrvatske (AMZH) i (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) smjernicama EUCAST-a
- Kod pretraživanja kliconoštva radi se antibiogram, ali se najčešće ne izdaje (ovisno o dogovoru s kliničarem)
- Mikroorganizme s neobičnom ili neočekivanom rezistencijom (npr. VRSA), laboratorijskim i kliničkim nejasnoćama potrebno je poslati u odgovarajući referentni laboratorij

1.3.5. Izdavanje nalaza

Negativan nalaz ovisno o tome koji se uzročnik tražio:

- *S. aureus* nije izoliran/MRSA nije izoliran
- *Klebsiella rhinoscleromatis/ozenae* nije izolirana

Pozitivan nalaz:

- *S. aureus* bez antibiograma uz opasku*
* *S.aureus* često kolonizira sluznicu nosa. O kliničkoj značajnosti potrebno je posavjetovati se s liječnikom mikrobiologom.
- MRSA s ili bez antibiograma (ovisno o dogovoru s kliničarem)
- *Klebsiella rhinoscleromatis/ozenae* s antibiogramom

1.4. BRIS ŽDRIJELA

1.4.1. Uvod

- Najčešći uzročnik bakterijskog faringitisa je beta-hemolitički streptokok grupe A (BHS-A)
- Ostale uzročnike nije potrebno rutinski obrađivati, osim na zahtjev kliničara (grupa C i G streptokoka, *Arcanobacterium haemolyticum*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium ulcerans*, *Neisseria gonorrhoeae*) (7,12)
- Vincentova angina ili akutni nekrotizirajući ulcerativni gingivitis stanje je karakterizirano faringitisom i teškom upalom zubnog mesa, a uzrokovano je anaerobnim fuziformnim štapićima i *Borrelia vincentii*. Dijagnoza se postavlja na temelju kliničke slike i Gram preparata.
- Lemierreovu bolest uzrokuje *Fusobacterium necrophorum*, rjeđe druge vrste iz roda *Fusobacterium*. Klinički uzorak je hemokultura.

1.4.2. Prikupljanje, transport i pohrana uzorka

- Bris je potrebno uzeti pamučnim štapićem, tako da se pobriše stražnja stjenka orofarinksa te obje tonzile ili oba nepčana luka, pazeći da pritom ne dodirujemo jezik ili bukalnu sluznicu
- Uzorke je potrebno transportirati i obraditi što je prije moguće
- Bris je potrebno transportirati na jedan od sljedećih načina:
 - o bez transportnog medija na sobnoj temperaturi (ST) do 2 h od uzimanja uzorka
 - o u transportnom mediju (Stuart, Amies) do 24 h na ST od uzimanja uzorka
 - o ako nema transportnog medija, manje povoljna ali prihvatljiva opcija je uzorak pohraniti i transportirati na +4°C, do 24 h od uzimanja uzorka

1.4.3. Kultivacija

Tablica 4. Kultivacija brisa ždrijela

Klinička slika/indikacija	Standardni medij	Inkubacija			Očitavanje kultura	Traženi mikroorganizam
		Temp °C	Atmosfera	Vrijeme		
grlobolja faringitis tonzilitis	krvni agar s ovčjom krvi	35-37	5-10% CO ₂	40-48 h	nakon 24 h i 48 h	BHS-A
U specifičnim slučajevima:*						
membranozni faringitis/tonzilitis putovanje u inozemstvo	Hoyle teluritni agar	35-37	aerobno	24-48 h	nakon 24 h i 48 h	toksigene <i>C. diphtheriae</i> i <i>C. ulcerans</i>
gonoreja, <i>N. meningitidis</i> izvor ili kontakt	čokoladni agar za gonokok selektivni čokoladni agar	35-37	5-10% CO ₂	40-48 h	≥ 40 h	<i>N. gonorrhoeae</i> <i>N. meningitidis</i>
tonzilitis, faringitis i osip	krvni agar	35-37	5-10% CO ₂	40-48 h	≥ 48 h	<i>A. haemolyticum</i>
dijabetes imunosuprimirani oralna kandidijaza	Sabouraud agar	35-37	aerobno	40-48 h	≥ 40 h	gljive

* U dogovoru s kliničarem ili ako je specifični uzročnik naznačen na uputnici

1.4.4. Identifikacija patogena i testiranje osjetljivosti na antibiotike

- Identifikacija se izvodi u skladu s laboratorijskim postupcima za identifikaciju mikroorganizama
- Testiranje osjetljivosti na antibiotike izvodi se u skladu s smjernicama Odbora za praćenje rezistencije Akademije medicinskih znanosti Hrvatske (AMZH) i smjernicama EUCAST-a (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*)

1.4.5. Izdavanje nalaza

Negativan nalaz:

- BHS-A nije izoliran
- Ovisno o traženom uzročniku iz Tablice 4: "*Traženi uzročnik*" nije izoliran

Pozitivan nalaz:

- Izdati BHS-A s antibiogramom
- Traženi mikroorganizam iz Tablice 4 s antibiogramom
- **Pozitivan nalaz na *N. gonorrhoeae/meningitidis* te *Corynebacterium diphtheriae/ulcerans* potrebno je odmah javiti liječniku telefonom, i prije nego što je nalaz s antibiogramom završen!**

1.5. BRIS NAZOFARINKSA

1.5.1. Uvod

Bris nazofarinksa uzima se samo za indikacije spomenute u tablici 1:

- pertusis
- difterija
- streptokokni faringitis u male djece
- meningokokno kliconoštvo

Bris nazofarinksa se ne bi trebao rutinski obrađivati kod sumnje na upalu srednjeg uha, sinusitisa ili infekcija donjeg dijela dišnog sustava (1,6,8,10,11,15).

Na uputnici je potrebno naznačiti traženi patogen.

1.5.2. Prikupljanje, transport i pohrana uzorka

1.5.2.1. Bris nazofarinksa na *B. pertussis* i *B. parapertussis*

- Osim kultivacije brisa nazofarinksa, bordetele je moguće detektirati i PCR-om i do 60 dana nakon pojave simptoma, a serologija se provodi ako kašalj traje ≥ 2 tjedna
- Uzorak za bakteriološku obradu potrebno je uzeti što prije nakon pojave simptoma - najkasnije do 4 tjedna nakon pojave simptoma, ako nije započeto antimikrobno liječenje.
- U svrhu pravilnog prikupljanja uzorka potrebno je koristiti **najlonski (Dacron)** brisni štapić kojim horizontalno, prateći nosni hodnik, dođemo do stražnjeg nazofarinksa te ga izvučemo nakon cca 5 s ili što je dulje moguće, da se sekret iz stražnjeg nazofarinksa upije (*B. pertussis* ima bolji afinitet za najlonski štapić nego običan pamučni, a on je ujedno i manje inhibitoran za PCR) (1,5,6).
- Uzorke je potrebno transportirati i obraditi što je prije moguće
- Bris je potrebno transportirati u transportnom mediju (Regan-Lowe) na ST do 24 h (6)

1.5.2.2. Bris nazofarinksa na difteriju, meningokok i BHS-A

- Obični tanki bris uvodi se horizontalno, prateći nosni hodnik, do stražnje stijenke nazofarinksa te bris izvući nakon 5 s (ili što je dulje moguće)
- Daljnji postupak s brisom isti je kao kod brisa ždrijela (vidi pod 1.4.2)

1.5.3. Kultivacija

1.5.3.1. Kultivacija brisa nazofarinksa na bordetele

Tablica 5. Kultivacija brisa nazofarinksa na bordetele

Klinička slika/ indikacija	Standardni medij	Inkubacija			Očitavanje kultura	Traženi mikroorganizam
		Temp °C	Atmosfera	Vrijeme		
hripavac /pertusis	Bordet-Gengou/ Regan-Lowe	35	aerobno vlažno	7 d	4 d i 7 d	<i>B. pertussis</i> <i>B. parapertussis</i>

- Ploče je potrebno staviti u **aerobnu vlažnu** atmosferu na temperaturu od 35 °C (temperatura od 37 °C ne dozvoljava rast mnogim sojevima *B. pertussis*) (1).

1.5.3.2. Kultivacija brisa nazofarinksa na difteriju, meningokok i BHS-A

- jednaka je kultivaciji brisa ždrijela na spomenute patogene (Tablica 4)

1.5.4. Identifikacija patogena i testiranje osjetljivosti na antibiotike

- Identifikacija se izvodi u skladu s laboratorijskim postupcima za identifikaciju mikroorganizama
- Testiranje osjetljivosti na antibiotike izvodi se sukladno smjernicama Odbora za praćenje rezistencije Akademije medicinskih znanosti Hrvatske (AMZH) i smjernicama EUCAST-a (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*)

1.5.5. Izdavanje nalaza

Negativan nalaz: "Traženi mikroorganizam" nije izoliran

Pozitivan nalaz: "Traženi mikroorganizam" s antibiogramom

- **Pozitivan nalaz traženog patogena potrebno je javiti telefonom liječniku, i prije nego što je nalaz završen!**

1.6. BRIS UHA

1.6.1. Uvod

Uzročnici upale srednjeg uha i zvukovoda bitno se razlikuju te će obrada brisa uha kod ova dva različita klinička entiteta biti prikazana odvojeno.

1.6.2. Obrada brisa uha kod upale vanjskog zvukovoda

Infekcija vanjskog zvukovoda slična bilo kojoj infekciji kože i mekih česti. Uzročnici upale zvukovoda uključuju sljedeće mikroorganizme:

- **Akutna upala:** *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*, BHS-A, *Vibrio alginolyticus*
- **Kronična upala:** kandida, plijesni, mikobakterije, nokardija
 - o “plivačevo uho” – *P. aeruginosa*, *S. aureus*, anaerobi u polimikrobnim infekcijama
 - o maligni otitis externa (uglavnom u dijabetičara, imunokompromitiranih) - najčešće uzrokovan *P. aeruginosa*

1.6.2.1. Prikupljanje, transport i pohrana uzorka

- Sterilnim *pamučnim* brisom, prethodno navlaženim u sterilnoj fiziološkoj otopini, pobrisati vanjski kanal pri čemu treba bris rotirati
- Prije uzimanja brisa odstraniti eventualne kruste fiziološkom otopinom
- Ukoliko sumnjamo na gljivičnu infekciju, strugotine kože su bolji uzorak od brisa
- Uzorke je potrebno transportirati i obraditi što je prije moguće
- Bris je potrebno transportirati na jedan od sljedećih načina:
 - o bez transportnog medija na sobnoj temperaturi (ST) do 2 h od uzimanja uzorka
 - o u transportnom mediju (Stuart, Amies) do 24 h na ST od uzimanja uzorka
 - o ako nema transportnog medija, manje povoljna ali prihvatljiva opcija je uzorak pohraniti i transportirati na +4°C, do 24 h od uzimanja uzorka

1.6.3. Obrada brisa uha i tekućine dobivene timpanocentezom kod upale srednjeg uha

Najčešći uzročnici upale srednjeg uha su virusi. Najčešći bakterijski uzročnici upale su *S. pneumoniae*, *H. influenzae* i *M. catarrhalis*. Rjeđi uzročnici upale srednjeg uha uključuju *Alloicoccus otitidis*, *S. aureus*, *BHS-A* i enterobakterije. Kroničnu upalu srednjeg uha najčešće uzrokuju *S. aureus*/MRSA, *Pseudomonas* spp. i anaerobi.

1.6.3.1. Prikupljanje, transport i pohrana uzorka

- **Bris nazofarinksa nije adekvatan uzorak za dijagnostiku upale srednjeg uha!**
- Adekvatan uzorak za dijagnostiku upale srednjeg uha je **sadržaj iz srednjeg uha** kojeg je moguće dobiti ili timpanocentezom ili obriskom nakon spontane perforacije bubnjića
- Aspirirati iglom sadržaj iz srednjeg uha
- Ukoliko je došlo do perforacije bubnjića i tekućina spontano curi, potonju je potrebno pokupiti sterilnim brisom
- Uzorke je potrebno transportirati i obraditi što je prije moguće
- Bris je potrebno transportirati na jedan od sljedećih načina:
 - o bez transportnog medija na sobnoj temperaturi (ST) do 2 h od uzimanja uzorka
 - o u transportnom mediju (Stuart, Amies) do 24 h na ST od uzimanja uzorka
 - o ako nema transportnog medija, manje povoljna ali prihvatljiva opcija je uzorak pohraniti i transportirati na +4°C, do 24 h od uzimanja uzorka

1.6.4. Kultivacija

Tablica 6. Kultivacija uzoraka iz uha

Klinička slika/indikacija	Standardni medij	Inkubacija			Očitavanje kultura	Traženi mikroorganizam
		Temp °C	Atmosfera	Vrijeme		
Otitis externa						
otitis externa	krvni agar čokoladni agar	35-37	5-10 % CO ₂	40-48 h	dnevno	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> BHS-A <i>S. aureus</i> <i>Vibrio alginolyticus</i>
U slučaju kronične infekcije dodati:						
kronični otitis externa	MacConkey agar	35-37	aerobno	16-24 h	≥16 h	<i>Pseudomonas</i> spp. enterobakterije
	Sabouraud agar	35-37	aerobno	40-48 h	≥40 h	gljive
U specifičnim slučajevima dodati:						
“plivačevo uho”	krvni agar	35-37	anaerobni uvjeti	48 h	≥40 h	anaerobi
Otitis media						
tekućina iz srednjeg uha/bris iz srednjeg uha	krvni agar čokoladni agar	35-37	5-10 % CO ₂	7 d	dnevno	bilo koji mikroorganizam*
	krvni agar	35-37	anaerobni uvjeti	7 d	≥40 h dnevno	anaerobi

* Svaki mikroorganizam koji poraste na ploči smatra se značajnim, jer je riječ o invazivnom uzorku i primarno sterilnom materijalu, potrebno je obratiti pažnju na mogućnost kontaminacije kožnom mikrobiotom zvukovoda

1.6.5. Identifikacija patogena i testiranje osjetljivosti na antibiotike

- Identifikacija se izvodi u skladu s laboratorijskim postupcima za identifikaciju mikroorganizama
- Testiranje osjetljivosti na antibiotike izvodi se sukladno smjernicama Odbora za praćenje rezistencije Akademije medicinskih znanosti Hrvatske (AMZH) i smjernicama EUCAST-a (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*)

1.6.6. Izdavanje nalaza

Negativan nalaz:

- Sterilno
- Klinički značajne bakterije nisu izolirane

Pozitivan nalaz:

- Mikroorganizam iz Tablice 6 s antibiogramom
- **Izolaciju značajnog mikroorganizma potrebno je javiti telefonom liječniku i prije nego što je nalaz završen!**

1.7. ASPIRAT SINUSA

1.7.1. Uvod

Etiologija sinusitisa ovisi o patogenezu i može se podijeliti na sljedeće kliničke entitete (1,10,11).

- **Akutni sinusitis:**

- o **Izvanbolnički**

- Uzrokovan virusima, bakterijama, gljivama ili miješane (bakterijska i virusna) infekcije
- Najčešći bakterijski uzročnici uključuju:
 - *Streptococcus pneumoniae*
 - *Haemophilus influenzae*
 - streptokoke “anginosus” grupe (*Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus* i *Streptococcus intermedius*)
 - ostale α -hemolitičke streptokoke
 - beta-hemolitičke streptokoke grupe A
 - *Staphylococcus aureus*
 - *Moraxella catarrhalis* (češća u dječjoj dobi)
 - anaerobe (rijetko u djece)

- o **Bolnički**

- Nakon traume glave ili prolongirane nazotrahealne/ nazogastrične intubacije: *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *Proteus mirabilis*, često polimikrobna infekcija
- U imunokompromitiranih pacijenata: *Pseudomonas aeruginosa*, plijesni iz roda *Aspergillus* (uglavnom *Aspergillus flavus*), *Rhizopus* i *Mucor*, *Sporothrix schenckii* i *Scedosporium apiospermum*, *Candida* spp. i *Cryptococcus neoformans*

- o **Alergijski** – alergijskom sinusitisu često prethodi alergijski rinitis, i simptomi (začepljenost, iscjedak i gubitak osjeta njuha) su zajednički

- **Kronični sinusitis:**

- o može se javiti kao postoperativna komplikacija, a može biti vezan i uz urođeni sindrom imunodeficiencije ili uz nosne polipe
- o etiologija uključuje: *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, streptokoki "anginosus" grupe, *M. catarrhalis*, *S. aureus*, *Pseudomonas* spp, anaerobi kao *Peptostreptococcus* spp., *Propionibacterium* spp., *Fusobacterium* spp., *Prevotella* spp. te ostale anaerobne gram-negativne bakterije

1.7.2. Prikupljanje, transport i pohrana uzorka

- **Bris nazofarinksa nije adekvatan uzorak za dijagnostiku sinusitisa!**
- Adekvatan uzorak je **aspirat ili ispirak sinusa**, dobiven punkcijom sinusa
- Uzorak uzima liječnik specijalist ORL
- Minimalna količina uzorka je 1 ml; veća količina gnojnog materijala održat će anaerobe dulje vijabilnima
- Uzorke je potrebno transportirati i obraditi što je prije moguće (anaerobe je posebno teško kultivirati, ukoliko je transport zakašnjeo)
- Ako je obrada odgođena, uzorci se mogu pohraniti na sobnoj temperaturi (ST) ili na +4°C do 24 h

1.7.3. Mikroskopski preparat

- Sluzavi uzorak – sterilnom ezom odabrati gnojan/krvav dio uzorka, razmazati ga po predmetnom stakalcu te obojati po Gramu
- Vodenasti uzorak – potrebno je najprije centrifugirati, staviti kap sedimenta na stakalce te obojati po Gramu

1.7.4. Kultivacija

Tablica 7. Kultivacija uzoraka iz sinusa

Klinička slika/indikacija	Standardni medij	Inkubacija			Očitavanje kultura	Traženi mikroorganizam
		Temp °C	Atmosfera	Vrijeme		
sinusitis	krvni agar čokoladni agar	35-37	5-10% CO ₂	40-48 h	dnevno	β-hemolitički streptokoki enterobakterije <i>H. influenzae</i> <i>M. catarrhalis</i> <i>Pseudomonas</i> spp. <i>S. aureus</i> <i>S. anginosus</i> grupa <i>S. pneumoniae</i>
	krvni agar	35-37	anaerobni uvjeti	5-7 d	≥48 h dnevno	anaerobi
	Sabouraud agar	30 i 35-37	aerobno	5 d	≥40 h dnevno	gljive
U specifičnim slučajevima:						
ukoliko mikroskopski postoji sumnja na miješanu infekciju	MacConkey agar	35-37	aerobno	16-24 h	≥16 h	enterobakterije <i>Pseudomonas</i> spp.

- Prije kultivacije preporuča se prethodna obrada uzorka – mukoidni uzorci N-acetyl L-cisteinom, vodenasti uzorci centrifugiranjem (10)

1.7.5. Identifikacija patogena i testiranje osjetljivosti na antibiotike

- Identifikacija se izvodi u skladu s laboratorijskim postupcima za identifikaciju mikroorganizama
- Testiranje osjetljivosti na antibiotike izvodi se sukladno smjernicama Odbora za praćenje rezistencije Akademije medicinskih znanosti Hrvatske (AMZH) i smjernicama EUCAST-a (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*)

1.7.6. Izdavanje nalaza

Mikroskopski preparat – opisati jesu li viđeni polimorfonukleari (PMN) i mikroorganizmi (bakterije, prisutnost hifa, kvasaca)

Negativan nalaz:

- Klinički značajne bakterije nisu izolirane/izolirana je miješana flora gornjih dišnih puteva
- Sterilan

Pozitivan nalaz:

- Mikroorganizam iz Tablice 7 s antibiogramom
- **Klinički značajan mikroorganizam potrebno je javiti telefonom liječniku, i prije nego što je nalaz završen!!!**

1.8. BRIS OKA

1.8.1. Uvod

Infekcije oka dijele se na slijedeće entitete (1,9,17):

- **Konjunktivitis** – upala konjunktiva može biti akutna ili kronična i najčešće ju uzrokuju virusi. Od bakterijskih uzročnika najčešći su:
 - *S. aureus*
 - *Streptococcus pneumoniae*
 - *Haemophilus influenzae*
 - *Moraxella catarrhalis*
 - *Neisseria gonorrhoeae*
 - *Chlamydia trachomatis**
 - Ostali rjeđi uzročnici su streptokoki grupe A, C i G, *Neisseria cinerea*, *P. acnes*, *Moraxella* spp., ostali gram-negativni štapići, anaerobi kao *Eubacterium* spp. i *Peptostreptococcus* spp., *Neisseria meningitidis*
Neonatalne infekcije najčešće uzrokuju: *N. gonorrhoeae*, *Haemophilus parainfluenzae*, hemolitički streptokok grupe B, enterokok, enterobakterije kao *Klebsiella pneumoniae* i *Proteus mirabilis*, te *Pseudomonas aeruginosa*
- **Blefaritis** – upala vjeđa koju najčešće uzrokuju *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Corynebacterium* spp.
 - o blefarokonjunktivitis je infekcija konjunktive i vjeđa zajedno
- **Keratitis** – upala rožnice vrlo je ozbiljno stanje koje može dovesti do perforacije i sljepoće. Predisponirajući faktori su prijašnja bolest oka, nošenje kontaktnih leća, uporaba topičkih kortikosteroida. Upala može biti uzrokovana velikim brojem bakterija, gljiva i parazita: stafilokoki, streptokoki, *Pseudomonas* spp. (vezana uz nošenje kontaktnih leća), enterobakterije, *Acanthamoebae***, *Aspergillus*, *Candida*, *Fusarium*

* Dijagnostika se zasniva na molekularnim i serološkim metodama koje nisu obuhvaćene ovim smjernicama

** Parazitološka dijagnostika nije obuhvaćena ovim smjernicama

- **Endoftalmitis** – upala prednjeg i stražnjeg segmenta oka, staklastog tijela i očnih sobica. Dijeli se na egzogeni koji je češći i nastaje nakon traume ili operacija te endogeni (metastatski) koji se širi hematogenim putem. Najčešći uzročnici egzogenog endoftalmitisa su gram pozitivni koki (>90%) i to koagulaza negativni stafilocoki (*S. epidermidis*), *S. aureus* te streptokoki. Među gram-negativnim bakterijama, najčešći uzročnici su *Pseudomonas aeruginosa*, *H. influenzae* i *Proteus* spp. Endogeni endoftalmitis je najčešće gljivična infekcija (>50%), sa *Candida albicans* i *Aspergillus* spp. kao vodećim uzročnicima. Od bakterija na prvom mjestu je *S. aureus*, te streptokoki i gram-negativne bakterije. Rjeđi bakterijski uzročnici su *Bacillus* spp., *Clostridium* spp., *Nocardia* spp., *Actinomyces* spp. te *Mycobacterium tuberculosis*.
- **Orbitalni celulitis** – nastaje nakon traume, operacije ili nakon infekcije paranazalnih sinusa. Riječ je o ozbiljnoj infekciji koja može uzrokovati sljepoću, septičku trombozu kavernoznog sinusa i intrakranijske infekcije. Najčešći uzročnici su *S. aureus*, streptokoki i anaerobi. U djece *H. influenzae* je i dalje najčešći uzročnik, ali kapsulirani sojevi (tip B) su rijetki.

Bris oka je često kontaminiran normalnom mikrobiotom kože (1,9,11).

Tablica 8. Očekivani patogeni i vjerojatni kontaminanti u uzorcima oka (1)

Infekcija oka/uzorak	Očekivani patogen	Vjerojatna kontaminacija*	Ostali rjeđi uzročnici
Bakterijski konjunktivitis/bris konjunktive	<i>S. aureus</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Moraxella catarrhalis</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , BHS-A	Koagulaza negativni stafilocoki (KNS)	<i>P. aeruginosa</i> i enterobakterije u imunokompromitiranih
Bakterijski keratitis/strugotina rožnice	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>Moraxella</i> spp., <i>S. aureus</i> , viridans streptokoki	KNS, difteroidi, <i>Propionibacterium acnes</i> , viridans streptokoki	enterobakterije, <i>H. influenzae</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Fusarium</i> spp., meningokok, gonokok, <i>Acanthamoeba</i> spp., <i>Bacillus</i> spp. (nositelji leća)
Orbitalni celulitis/aspirat ili biopat	<i>S. aureus</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>H. influenzae</i> (djeca ispod 5 godina), <i>P. aeruginosa</i> , BHS-A, gram-negativni štapići	KNS, difteroidi	Trauma – miješana kultura aeroba i anaeroba
Blefaritis/bris vjeđe	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>Corynebacterium</i> spp.	KNS, difteroidi	<i>P. acnes</i>

* Navedeni uzročnici najčešće predstavljaju kontaminaciju, no ako se izoliraju u ponavljanim uzorcima u čistoj kulturi, mogu imati klinički značaj

1.8.2. Prikupljanje, transport i pohrana uzorka

- Bris na klamidiju i viruse potrebno je uzeti prije nego što je instiliran topički anestetik u oko
- Uz bilo koji uzorak uzet invazivnom metodom, potrebno je poslati i bris konjunktive kako bi se lakše razlučio patogen (prisutan samo u invazivnom izolatu) od kolonizacije (uzročnik prisutan u oba uzorka)
- Obavezno uzeti uzorke oba oka zasebnim brisevima
- Uzorke je potrebno transportirati i obraditi što je prije moguće
- Bris je potrebno transportirati na jedan od sljedećih načina:
 - o bez transportnog medija na sobnoj temperaturi (ST) do 2 h od uzimanja uzorka
 - o u transportnom mediju (Stuart, Amies) do 24 h od uzimanja uzorka
 - o ako nema transportnog medija, manje povoljna ali prihvatljiva opcija je uzorak pohraniti i transportirati na +4°C, do 24 h od uzimanja uzorka
- **Konjunktivitis** – bris uzeti sterilnim štapićem navlaženim u sterilnoj fiziološkoj otopini. Prvim brisom potrebno je pokupiti sluz i odbaciti ga. Drugim brisom potrebno je obrisati konjunktivu, pazeći pritom da se ne dotakne kožni dio vjeđe.
 - o potrebno je uzeti dva brisa, za lijevo i desno oko
- **Blefaritis** – bris uzeti sterilnim navlaženim štapićem kojim se pređe preko vjeđe
- **Keratitis** – nakapati topički anestetik pa sastrugati posebnom špatulom rub ulceracije; uzeti 3-5 strugotina sa svakog oka
- **Endoftalmitis** – uzeti aspirat vitrozne tekućine ili učiniti paracentezu prednje očne sobice
 - o paralelno uzeti i bris konjunktive (zbog procjene značajnosti uzročnika)
- **Celulitis** – aspirat ili bioptat rane, potrebno je uzeti i hemokulture
- **Dakrioadenitis** – brisom pokupiti purulentni iscjedak; nije potrebno aspirirati iglom lakrimalnu žlijezdu
- **Dakriocistitis** – pritiskom na lakrimalnu vrećicu prikupiti eksudat aspiracijom; uz to uzeti i bris konjunktive

1.8.3. Kultivacija

Tablica 9. Kultivacija uzoraka iz oka (9)

Klinička slika/indikacija	Standardni medij	Inkubacija			Očitavanje kultura	Traženi mikroorganizam
		Temp°C	Atmosfera	Vrijeme		
Blefaritis konjunktivitis "red eye"	krvni/čokoladni agar	35-37	5-10% CO ₂	40-48 h	dnevno	<i>H. influenzae</i> streptokoki grupe A,B,C i G <i>Moraxella</i> spp. <i>N. gonorrhoeae</i> * <i>N. meningitidis</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>S. aureus</i> <i>S. pneumoniae</i> KNS** korinebakterije**
U specifičnim slučajevima:						
Gonokokna infekcija neonatusi	čokoladni agar	35-37	5-10% CO ₂	40-48 h	≥40 h	<i>N. gonorrhoeae</i> *
Imunokompromitirani kronični blefaritis	Sabouraud agar	28-30	aerobno	40-48 h	≥40 h	gljive
Orbitalni celulitis nakon operacije, traume	krvni agar	35-37	anaerobno	40-48 h 10 d	≥40 h ≥40 h i na 7.d i 10.d	anaerobi aktinomicete

* Indikacija za pretragu u dogovoru s kliničarem ili uz posebnu naznaku na uputnici

** U konzultaciji s kliničarem, samo kod blefaritisa. Kako se radi o čestim kontaminantima, potrebno je uzeti u obzir samo čistu kulturu u dva uzastopno uzeta brisa

1.8.4. Identifikacija patogena i testiranje osjetljivosti na antibiotike

- Identifikacija se izvodi u skladu s laboratorijskim postupcima za identifikaciju mikroorganizama
- Testiranje osjetljivosti na antibiotike izvodi se u skladu sa smjericama Odbora za praćenje rezistencije Akademije medicinskih znanosti Hrvatske (AMZH) i smjericama EUCAST-a (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*)
- *Candida* spp. se rutinski identificiraju do razine *Candida albicans*/*Candida non albicans*, a potrebu za identifikacijom do razine vrste i osjetljivošću na antimikotike potrebno je procijeniti za pojedinačne pacijente, u dogovoru s kliničarem

1.8.5. Izdavanje nalaza

Negativan nalaz:

- klinički značajni mikroorganizmi nisu izolirani
- sterilno

Pozitivan nalaz:

- mikroorganizam iz Tablice 8 s antibiogramom

2. DONJI DIŠNI SUSTAV

2.1. UVOD

Infekcije donjeg dijela dišnog sustava obuhvaćaju **pneumoniju** (upalu plućnog parenhima), **bronhitis** (upala bronhijalnog stabla), **bronhiolitis** (upala u malim dišnim putevima, bronhiolima), **apsces pluća** (kolekcija gnoja u plućnom parenhimu), **empijem** (nakupina gnoja u pleuralnom prostoru) te **cističnu fibrozu** (nasljednu bolest u kojoj viskozni sekret u dišnim putevima uzrokuje trajnu upalu).

Veliku važnost u dijagnostici infekcija donjeg dijela dišnog sustava imaju adekvatno prikupljeni uzorci koji moraju potjecati iz donjeg dijela dišnog sustava i što manje biti kontaminirani mikrobiotom iz gornjeg dijela dišnog sustava (1,11,15).

U uzorcima iz donjeg dijela dišnog sustava često je prisutan veći broj različitih bakterijskih vrsta te je ponekad teško razlikovati kolonizaciju od prave infekcije.

Veliku pomoć pri određivanju **adekvatnosti primarno nesterilnih uzoraka**, poput sputuma i endotrahealnog aspirata (ETA), ima upravo **preparat po Gramu** koji mora zadovoljiti određene kriterije:

- Veliki broj autora temelji procjenu kvalitete uzorka na **broju epitelnih stanica (ES) i/ili polimorfonuklearnih neutrofila (PMN) po vidnom polju** (procijenjeno mikroskopiranjem 10 vidnih polja) pod malim povećanjem (10x10) (13); pritom se adekvatnim uzorkom najčešće smatra **<10 ES i >25 PMN** u jednom vidnom polju
- Nekim autorima je kriterij za odbacivanje uzoraka **omjer neutrofila i epitelnih stanica**. Pri tome se adekvatnim uzorkom smatra **omjer PMN:ES>2:1**. Prednost korištenja omjera PMN/ES mogućnost je kompenzacije neravnomjerne distribucije stanica prilikom izrade preparata, odnosno, debljine preparata (14)
- Veliki broj epitelnih stanica u pravilu znači kontaminaciju orofaringealnim sekretom, a mikroorganizmi fagocitirani u PMN viđeni u gram preparatu indikativni su za infekciju
- Kod imunosuprimiranih osoba potrebno je uzeti u obzir moguću neutropeniju koja će utjecati i na broj PMN u uzorku iz respiratornog trakta
- **Minimalni kriterij za neadekvatnost uzorka je broj ES>10 po vidnom polju (10x10 povećanje)!**

2.1.1. Etiologija infekcija donjeg dijela dišnog sustava

- **Pneumonija:**
 - **izvanbolnička pneumonija**
 - *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis*
 - *S. aureus* (nakon influence ili hematogenog rasapa)
 - *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Chlamydophila psittaci*, *Coxiella burnetii*, *Legionella pneumophila**
 - *Klebsiella pneumoniae* (teška nekrotizirajuća pneumonija u alkoholičara i beskućnika)
 - enterobakterije su rijetki uzročnici izvanbolničke pneumonije
 - **Bolnička pneumonija**
 - *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, enterobakterije, MRSA
 - Gljivične infekcije – *Aspergillus* spp., *Pneumocystis jirovecii**
 - *Candida* spp. vrlo rijetko uzrokuju infekciju donjeg dijela dišnog sustava (eventualno u sklopu hematogenog rasapa), a često koloniziraju sluznicu dišnog sustava
- **Apsces pluća:** *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *Streptococcus anginosus* grupa (u infektivnom endokarditisu), *Burkholderia pseudomallei*, *Fusobacterium necrophorum* (Lemierrova bolest)
- **Cistična fibroza:** *S. aureus*, *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*

* Dijagnostika se zasniva na molekularnim i serološkim metodama koje nisu obuhvaćene ovim smjernicama

2.2. UZORCI IZ DONJEG DIJELA DIŠNOG SUSTAVA

Uzorci iz donjeg dijela dišnog sustava uglavnom se prikupljaju invazivnim metodama. Jedina neinvazivna metoda uzorkovanja je ekspektorirani sputum. To je i najčešći uzorak donjeg dijela dišnog sustava koji se šalje u laboratorij.

2.2.1. Iskašljaj (sputum)

- **Ekspektorirani iskašljaj** – Uzorak je najbolje dati ujutro, nakon buđenja. Bolesnik ne bi trebao ispirati usta nesterilnom vodom prije davanja iskašljaja zbog moguće kontaminacije. Iskašljaj ne bi trebao sadržavati slinu ili nazalni iscjedak. Potrebno je duboko udahnuti nekoliko puta te se iskašljati u sterilnu posudu s navojem. Potrebna količina uzorka je ≥ 2 ml (minimalno 1 ml).
- **Inducirani iskašljaj** – Ukoliko se bolesnik ne može spontano iskašljati, inhalira se 10-20 min sa zagrijanom fiziološkom otopinom (FO) ili hipertoničnom otopinom (3-15%) soli. Inducirani sputum se nije pokazao posebno korisnim, osim za detekciju *P. jirovecii* i *M. tuberculosis* (1).

2.2.2. Endotrahealni aspirat (ETA)

- Kod intubiranih bolesnika, sterilnim kateterom aspirira se endotrahealni sadržaj. Kontaminacija uzorka je moguća, jer se sekret iz usne šupljine može cijediti uz endotrahealni tubus.
- **ETA ne bi trebalo uzimati, ukoliko bolesnik nema klinički suspektu pneumoniju, jer se traheostoma kolonizira 24 h nakon insercije te je kliničku značajnost izoliranih mikroorganizama teško interpretirati!**

2.2.3. Uzorci dobiveni bronhoskopijom

- Iako su uzorci uzeti invazivnom metodom, moguća je kontaminacija mikrobiotom usne šupljine.
- **Bronhoalveolarni lavat (BAL)** – segment pluća ispire se sterilnom FO nakon uvođenja fleksibilnog bronhoscopa. Dobiveni uzorak je iz distalnih bronhiola i alveola, ciljano iz područja zahvaćenog infekcijom. Potrebno je uzeti najmanje 1 ml uzorka.
- **Ispirak bronha** – uzorak se dobiva iz glavnih dišnih puteva (kao i u ETA)
- **Aspiracija četkicom** (*protected specimen brush*, PSB) – prikupljanje staničnih materijala (najbolji uzorak za virusološku i citološku analizu)

2.2.4. Primarno sterilni uzorci

- **Aspirat pluća** – iglom je potrebno ući kroz prsni koš u plućni infiltrat uz pomoć CT-a, uzorak poslati u šprici
- **Transtrahealni aspirat** – iglom širokog promjera s kateterom potrebno je ući kroz krikotiroidni prostor u traheju, nakon čega se igla izvuče, a kateter zaostane. Špricom koja je pričvršćena na kateter moguće je aspirirati sekret.
- **Bioptat pluća** – uzorak je potrebno poslati u sterilnoj posudici bez formalina
- **Pleuralna tekućina** – postupak uzimanja mora biti izveden po načelima antiseptike. Uzorkuje se špricom i iglom te je potrebno uzeti što više materijala. Dobiveni materijal potrebno je staviti u transportnu podlogu za anaerobe, a dio materijala ostaviti u šprici i donijeti u laboratorij kako bi se napravio mikroskopski preparat.

2.3. TRANSPORT I POHRANA UZORAKA

2.3.1. Primarno nesterilni uzorci (iskašljaj, ETA, BAL)

- Uzorke je potrebno transportirati i obraditi što je prije moguće
- Uzorci se dostavljaju u sterilnoj posudi s navojem od 15 ml na ST do 2 h od uzimanja ili na +4°C do 24 h

2.3.2. Primarno sterilni uzorci

- Uzorke je potrebno dostaviti u laboratorij što je prije moguće u sterilnoj posudici s navojem. Do 24 h uzorak može stajati na ST, po mogućnosti u anaerobnom transportnom mediju (16).
- Manje količine bioptata potrebno je staviti u nekoliko kapi sterilne fiziološke otopine (FO) kako bi se zadržala vlažnost tkiva

2.4. KRITERIJI ZA ODBACIVANJE UZORAKA

2.4.1. U svrhu postavljanja dijagnostike infekcije donjeg respiratornog trakta, potrebno je odbaciti sljedeće uzorke:

- a) uzorke uzete u intervalima kraćim od 48 h
- b) 24-satni sputum
- c) neadekvatni sputum i endotrahealni aspirat, procijenjeno prema Gram preparatu (vidi 2.4.2)
- d) nazalne ispirke, aspirate, briseve nazofarinksa i nosnica
- e) bris ždrijela
- f) uzorke za anaerobno nasađivanje (osim transtrahealnog aspirata, uzoraka dobivenih biopsijom, pleuralne tekućine)
- g) uzorke koji su u transportu više od 2 h, a bez pravilne pohrane, naznačiti da su mogući kompromitirani rezultati zbog neprikladnog transporta

2.4.2. Mikroskopski preparat iskašljaja, BAL-a, ETA

- **Mukoidni uzorak** – sterilnom ezom odabrati gnojan/krvav dio uzorka, razmazati po predmetnom stakalcu te obojati po Gramu (1)
- **Nemukoidni (tekući) uzorak** – kap sedimenta prethodno centrifugiranog uzorka staviti na stakalce i obojati po Gramu (1)
- Mikroskopirati pod povećanjem 10x10
- U nalazu je potrebno izvijestiti o broju ES (<10, 10-25, >25), PMN (<10, 10-25, >25) (vidi 2.1) i označiti količinu i vrstu viđenih mikroorganizama (malo, dosta, puno)
- Ukoliko je kod mikroskopiranja sputuma, nakon pregledanih 10 vidnih polja prosječno u jednom vidnom polju prisutno **>10 ES**, uzorak je potrebno odbaciti uz usmeno priopćenje kliničaru (16) ili je u komentar nalaza potrebno napisati: **Loša kvaliteta uzorka. Uzorak potječe iz gornjih dišnih puteva.** Prije odbacivanja uzorka, kvalitetu uzorka potrebno je procijeniti mikroskopiranjem uzorka uzetog s tri najsumnjivija (gnojna) mjesta.
- Ukoliko se u mikroskopskom preparatu vidi klinički značajan nalaz (malo ES, puno PMN, dominacija jedne vrste bakterija fagocitiranih u PMN), nalaz je potrebno telefonski javiti kliničaru isti dan
- Prema nekim autorima, sputum se prije obrade homogenizira s N-acetil L-cisteinom (NALC) (16)

2.5. KVANTITATIVNO NASAĐIVANJE ETA I UZORAKA DOBIVENIH BRONHOSKOPIJOM

Uzorci kontaminirani mikrobiotom usne šupljine nasađuju se kvantitativno kako bi se pomoglo u razlučivanju kontaminacije i infekcije.

- Uzorak za kvantitativnu obradu se ne centrifugira prije nasađivanja (1). Ukoliko je uzorak tekući, nakon nasađivanja centrifugira se za izradu mikroskopskog preparata (vidi 2.4.2)
- **Značajan broj bakterija („colony forming units“, CFU u 1 ml):**
 - o **ETA $\geq 10^5$ CFU/ml**
 - o **BAL $\geq 10^4$ CFU/ml**
 - o **PSB $\geq 10^3$ CFU/ml**
- Najjednostavnija metoda je nasađivanje kalibriranom ezom (10 μ l), kojom se nasadi 0,01 ml uzorka

Tablica 10. Interpretacija broja poraslih kolonija na ploči pri nasađivanju 10 μ l ezom

Broj kolonija	CFU/ml uzorka	značajnost		
		PSB	BAL	ETA
<10 kolonija na ploči	10^2	-	-	-
10-99 kolonija	10^3	+	-	-
100-999 kolonija	10^4	+	+	-
>1000 kolonija	10^5	+	+	+

Ovom metodom otežano je očitavanje značajnog broja za ETA ($\geq 10^5$) te se preporuča nasađivati ETA nakon razrjeđivanja uzorka 1:10 ili originalni uzorak nasaditi ezom od 1 μ l. U tom slučaju >100 kolonija na ploči znači 10^5 CFU/ml uzorka što je za ETA prag za značajan porast. Nedostatak nasađivanja s 1 μ l ezom je slaba reprezentativnost tako malog volumena uzorka.

- Broj kolonija u 1 ml uzorka najpreciznije se može odrediti u 20-rostrukom razrjeđenju uzorka na sljedeći način:
 - 0.5 ml uzorka razrijedi se s 9.5 ml fiziološke otopine
 - 50 μ l razrijeđenog uzorka nasadi se na ploču
 - Broj poraslih kolonija se označava kako je opisano u tablici 11.

Tablica 11. Interpretacija broja poraslih kolonija pri nasađivanju 20-rostrukog razrjeđenja uzorka

Broj kolonija	CFU/ml uzorka	značajnost		
		PSB	BAL	ETA
3 – 24 kolonije na ploči	10^3	+	-	-
24 - 249 kolonija	10^4	+	+	-
≥250 kolonija	$\geq 10^5$	+	+	+

2.6. KULTIVACIJA UZORAKA IZ DONJEG DIJELA DIŠNOG SUSTAVA

Tablica 12. Kultivacija uzoraka iz donjeg dijela dišnog sustava

Klinička slika/indikacija	Standardni medij	Inkubacija			Očitavanje kultura	Traženi mikroorganizam
		Temp °C	Atmosfera	Vrijeme		
bronhitis KOPB pneumonija	krvni agar čokoladni agar BAL i ETA: dodati MS te kvantitativno nasaditi na KA, MacConkey agar	35-37	5-10% CO ₂	40-48 h	dnevno	Vidi pod 2.7
U određenim situacijama, potrebno je dodati:						
Klinička slika/indikacija	Dodatni medij	Inkubacija			Očitavanje kultura	Traženi mikroorganizam
		Temp °C	Atmosfera	vrijeme		
bronhiektazije cistična fibroza imunokompromitirani	MacConkey agar	35-37	aerobno	40-48 h	dnevno	enterobakterije <i>Pseudomonas</i> spp.
	MS agar	35-37	aerobno	40-48 h	dnevno	<i>S. aureus</i>
	Sabouraud agar	35-37	aerobno	40-48 h	≥40 h	gljive
cistična fibroza	<i>B. cepacia</i> selektivna podloga	2 d 35-37 + 5 d 30	aerobno	7 d	≥40 h; potom dnevno	<i>B. cepacia</i> kompleks
mikološki	Sabouraud agar	35-37	aerobno	5 d	≥40 h dnevno	gljive

2.7. INTERPRETACIJA NALAZA U UZORCIMA IZ DONJEG DIJELA DIŠNOG SUSTAVA (1, 15)

1. Obraditi i izdavati u bilo kojem broju:

- a) BHS-A
- b) BHS-B za pedijatrijsku populaciju
- c) *Bordetella* spp. *
- d) *Streptococcus pneumoniae*
- e) *Haemophilus influenzae*
- f) *S. aureus*
- g) *Francisella tularensis**
- h) *Yersinia pestis**
- i) *Neisseria gonorrhoeae**
- j) *Nocardia* spp.
- k) *Bacillus anthracis**
- l) *Cryptococcus neoformans*
- m) plijesni koje imaju patogeni potencijal

*Indikaciju za pretragu dogovoriti s kliničarem

2. Obraditi i izdavati ako $\geq 10^4$ CFU/ml za BAL i $\geq 10^5$ CFU/ml za ETA, čak ako i ne dominiraju u kulturi:

- a) *Moraxella catarrhalis*
- b) *Neisseria meningitidis*

Za bolničke pacijente:

- c) *Pseudomonas aeruginosa*
- d) *Stenotrophomonas maltophilia*
- e) *Acinetobacter* spp.
- f) *Burkholderia* spp.

3. Obraditi i izdavati ako $\geq 10^4$ CFU/ml za BAL i $\geq 10^5$ CFU/ml za ETA samo ako dominiraju u kulturi:

- a) jedna vrsta gram-negativnih štapića (posebno *Klebsiella pneumoniae*)
- b) *Corynebacterium* spp. (JIL pacijenti)
- c) *Rhodococcus equi* (imunokompromitirani)
- d) BHS-B (odrasli), C, G

4. Obraditi i izdavati i u broju $< 10^4$ CFU/ml za BAL i $< 10^5$ CFU/ml za ETA:

Multiplerezistentni uzročnici – za potrebe kontrole bolničkih infekcija.

5. Ukoliko je u kulturi prisutno više od jedne vrste gram-negativnih štapića koji ne ulaze u gore navedene kriterije, u nalazu je potrebno navesti: „Porasla je miješana kultura gram-negativnih bakterija“.

6. Ukoliko su u kulturi porasli samo enterokoki i koagulaza-negativni stafilokoki (KNS), u nalazu je potrebno navesti: **“Porasla je miješana kultura gram-pozitivnih bakterija.”**
7. Ukoliko su u kulturi porasli viridans streptokoki, nepatogene najserije, KNS, *Haemophilus* spp. (ne *H. influenzae*), enterokoki i kvasnice*, u nalazu je potrebno navesti: **“Porasla je miješana mikrobiota gornjih dišnih puteva.”**

* Prisutnost *Candida* spp. može se naznačiti kod imunokompromitiranih pacijenata u sklopu evaluacije „Candida score“ rezultata. U slučaju izdavanja *Candida* spp. u nalazu se preporuča dodati opasku: „Kandide su sastavni dio mikrobiote usne šupljine i ne uzrokuju pneumoniju osim u iznimnim slučajevima.“

2.8. IDENTIFIKACIJA PATOGENA I TESTIRANJE OSJETLJIVOST NA ANTIBIOTIKE

- Identifikacija se izvodi u skladu s laboratorijskim postupcima za identifikaciju mikroorganizama
- Testiranje osjetljivosti na antibiotike izvodi se u skladu sa smjernicama Odbora za praćenje rezistencije Akademije medicinskih znanosti Hrvatske (AMZH) i smjernicama EUCAST-a (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*)

2.9. IZDAVANJE NALAZA UZORAKA IZ DONJEG DIJELA DIŠNOG SUSTAVA

Mikroskopski preparat – opisati broj PMN i ES te količinu i vrstu mikroorganizama

Negativan nalaz:

- klinički značajne bakterije nisu izolirane ili izolirana je miješana mikrobiota gornjih dišnih puteva
- sterilan

Pozitivan nalaz:

- “Klinički značajan organizam”, vidi 2.7/navesti broj bakterija u CFU/ml
- Obzirom na kriterije za procjenu adekvatnosti uzorka, moguće je u nalazu izdvojiti neki od izolata koji zadovoljava kriterije, a ostale navesti na sljedeći način:
 - o Porasla je miješana mikrobiota (gram-negativnih/pozitivnih) bakterija u kojoj prevladava gore navedeni izolat.

- o Ukoliko, prema mikroskopskom preparatu ocijenimo da je uzorak neadekvatan, u komentaru nalaza potrebno je navesti: ***Loša kvaliteta uzorka. Uzorak potječe iz gornjih dišnih puteva.***
- Klinički značajan mikroorganizam potrebno je javiti telefonom liječniku, i prije nego što je nalaz s antibiogramom završen!

REFERENCE

1. Isenberg HD. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 2nd ed. Washington DC; ASM Press: 2004.
2. WakeMed. Microbiology Collection Guidelines. URL: <http://www.wakemed.org/body.cfm?id=237>, pristup stranici 10. prosinca 2013.
3. URL: <http://www.guidel.com/webinars/rnd018592901s/HowToCollectASpecimen.pdf> pristup stranici 1. travnja 2014.
4. NYC Health. Nasopharyngeal Swab Collection Instructions. URL: <http://www.nyc.gov/html/doh/downloads/pdf/flu/h1n1-npswab.pdf>, pristup stranici 1. travnja 2014.
5. Standards Unit, Microbiology Services Division, HPA. UK Standards for Microbiology Investigations: Investigation of Nose Swabs. B5 Issue 6.2; 2012. URL: http://www.hpa.org.uk/webc/hpawebfile/hpaweb_c/1317132855931, pristup stranici 1. travnja 2014.
6. Standards Unit, Microbiology Services Division, HPA. UK Standards for Microbiology Investigations: Investigation of Specimens for Bordetella pertussis and Bordetella parapertussis. B6 Issue 7.1; 2012. URL: http://www.hpa.org.uk/webc/HPAwebFile/HPAweb_C/1317139934616
7. Standards Unit, Microbiology Services Division, HPA. UK Standards for Microbiology Investigations: Investigation of Throat Swabs. B9 Issue 8.2; 2012. URL: http://www.hpa.org.uk/webc/hpawebfile/hpaweb_c/1317132856329
8. Standards Unit, Microbiology Services Division, HPA. UK Standards for Microbiology Investigations, Investigation of Ear Swabs and Associated Specimens. B1 Issue 8.5; 2014. URL: http://www.hpa.org.uk/webc/hpawebfile/hpaweb_c/1317133338384
9. Standards Unit, Microbiology Services Division, HPA. UK Standards for Microbiology Investigations, Investigation of Eye Swabs and Canalicular Pus. B2 Issue 5.2; 2012. URL: http://www.hpa.org.uk/webc/hpawebfile/hpaweb_c/1317133339563

10. Standards Unit, Microbiology Services Division, HPA. UK Standards for Microbiology Investigations, Investigation of Sinus Aspirate. B19 Issue 7.2; 2012. URL:
http://www.hpa.org.uk/webc/hpawebfile/hpaweb_c/1317132858931
11. Hawkey P, Lewis D. Medical Bacteriology. 2nd ed. Oxford; OUP:2004.
12. Tambić Andrašević A., Baudoin T., Vukelić D., et al. Smjernice ISKRA za grlobolju: dijagnostički i terapijski pristup – hrvatske nacionalne smjernice. Liječ Vjesn 2009;131:181–191.
13. Beidas SO. Evaluation of sputum gram stain. Clin Infect Dis 1992;15:1048-49
14. Sadeghi E, Matlow A, MacLusky I, Karmali MA. Utility of Gram stain in evaluation of sputa from patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol 1994;32:54-8.
15. Standards Unit, Microbiology Services Division, HPA. UK Standards for Microbiology Investigations, Investigation of Bronchoalveolar Lavage, Sputum and Associated Specimens. B57 Issue 2.4; 2012. URL:
http://www.hpa.org.uk/webc/hpawebfile/hpaweb_c/1317132860548
16. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. Manual of Clinical Microbiology. 9th ed. ASM Press; Washington DC:2007.
17. Standards Unit, Microbiology Services Division, HPA. UK Standards for Microbiology Investigations, Investigation of Intraocular Fluids and Corneal Scrapings. B52 Issue 5.1; 2012. URL:
http://www.hpa.org.uk/webc/hpawebfile/hpaweb_c/1317132859960